

碳酸铵和碳酸氢铵对柑橘青霉病的抑制作用

柳丽梅 张强 杨书珍 王乐 周洁 彭丽桃

华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070

摘要 以引起柑橘采后青霉病的意大利青霉(*Penicilium italicum*)为研究对象,采用体外试验和体内试验测定碳酸铵和碳酸氢铵对病菌的抑菌活性。结果表明:碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉孢子萌发和菌丝体生长均有显著抑制作用;当碳酸铵和碳酸氢铵的质量分数分别为0.32%和0.36%时,2种铵盐均可以完全抑制意大利青霉的孢子萌发;当2种铵盐溶液分别经过4~100℃范围内的不同温度处理一定时间后,仍能表现出良好的抑菌活性;碳酸铵和碳酸氢铵在中性及偏碱性的环境中有利于抑菌活性的发挥。接种和自然贮藏试验结果表明,质量分数为0.80%的碳酸铵和碳酸氢铵溶液可以显著降低接种意大利青霉的柑橘果实和自然贮藏条件下柑橘果实青霉病的发病率。

关键词 柑橘;意大利青霉;碳酸铵;碳酸氢铵

中图分类号 S 482.2; S 666 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0065-05

由意大利青霉(*Penicilium italicum*)侵染柑橘果实引起的柑橘青霉病是柑橘贮藏过程中的重要病害^[1]。意大利青霉在自然界分布广泛,其生长能力较强,易从健康柑橘果实的果皮损伤处侵入果实,造成果实软化、腐烂和霉变^[2],每年有10%~30%的柑橘果实因感染柑橘青霉病而腐烂变质^[3]。柑橘青霉病的防治方法主要有物理、化学和生物防治法等。其中化学防治由于操作简单且成本低廉,在生产上应用广泛。目前,在柑橘贮藏过程中常用的化学杀菌剂主要有噻菌灵、抑霉唑、邻苯基苯酚钠、脲酰胺等,但长期大量使用这些化学药剂所产生的抗药性、农药残留和环境污染等问题已经越来越受到社会的广泛关注,因此,开发新型、安全高效的柑橘防腐保鲜剂具有重要意义^[4-5]。

碳酸氢铵和碳酸铵作为食品发酵剂,与碳酸氢钠结合使用可用于面包、饼干、煎饼等食品的膨松剂,也可作为发泡粉末果汁的原料,是一种安全的食品添加剂。Cerioni等^[6]报道碳酸盐作为一种无毒的盐类单独使用在柠檬采后病害的防治上效果并不明显,但与过氧化氢溶液在50℃条件下可发挥良好的保鲜效果。Youssef等^[7]的研究结果表明,碳酸氢铵与蜡混合对水果采后病害的防治有很好的效

果。笔者前期在研究碱性物质对柑橘青霉病的控制作用时,发现碳酸铵和碳酸氢铵对柑橘青霉病菌有显著抑制作用(待发表)。本试验从离体和活体两方面测定了碳酸氢铵和碳酸铵对柑橘青霉病的抑制作用,旨在为进一步研究碳酸铵和碳酸氢铵对柑橘青霉病的抑制机理和开发适合柑橘贮藏保鲜的防腐保鲜剂提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试菌意大利青霉(*P. italicum*)是从具有典型柑橘青霉病特征的柑橘果实上分离,通过孢子和菌落的形态学特征以及接种到健康果实上的感病特征进行鉴定,菌株在PDA培养基上于26℃培养箱中培养,并在4℃条件下保存待用。供试柑橘品种为中秋,采自湖北省武汉市洪山区先建村柑橘园。试验时将九成熟新鲜的柑橘采收后当天进行处理。

1.2 孢子萌发的观察

分别将碳酸铵、碳酸氢铵配成一定浓度的水溶液,然后取1 mL药液加入至9 mL PDA培养基中混合均匀,使各药液在培养基中的最终质量分数分别为0.20%、0.24%、0.28%、0.32%、0.36%,对照

收稿日期: 2013-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(32171969)和湖北省自然科学基金项目(2011cdb147)

柳丽梅, 硕士研究生. 研究方向: 果蔬加工与贮藏保鲜. E-mail: 13164609344@126.com

通信作者: 彭丽桃, 博士, 教授. 研究方向: 果蔬加工与贮藏保鲜. E-mail: penglit@mail.hzau.edu.com

以 1 mL 无菌水代替药液。将混合均匀的含药培养基涂布于已灭菌的载玻片上,待培养基凝固后,吸取 40 μL 浓度为 1×10^6 个孢子/mL 的意大利青霉孢子菌悬液接种在已经凝固的含药 PDA 培养基上。然后将载玻片放置在培养皿(底部铺 1 层吸水滤纸)内,于 26 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养。培养 12 h 后观察孢子的萌发情况,并按照下列公式计算孢子萌发率和药液对意大利青霉孢子萌发的抑菌率。

$$\text{孢子萌发率} = \frac{\text{视野内萌发的孢子数}}{\text{视野内总孢子数}} \times 100\%$$

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100\%$$

1.3 菌丝生长的观察

参考杨书珍等^[8]的方法,分别取 1 mL 药液加入至 19 mL 55 $^{\circ}\text{C}$ PDA 培养基中充分混匀,待含药培养基充分凝固后,将生长 12 h 的菌饼反贴至含药 PDA 培养基上,每皿呈等边三角形贴 3 块菌饼,于 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。每个处理设 3 次重复,定期测量菌饼直径。

1.4 2 种铵盐抑菌活性的测定

1) pH 值。分别将碳酸铵溶液和碳酸氢铵溶液用盐酸和氢氧化钠调 pH 值至 1、3、5、7、9、11 并放置 30 min,再分别取 1 mL 药液与 9 mL 培养基混合均匀,使碳酸铵和碳酸氢铵的最终质量分数分别为 0.24% 和 0.20%,对照以不含药液的具有相应 pH 值的无菌水代替。然后按照本文“1.2”中的方法进行孢子萌发试验,并计算药液对意大利青霉的抑菌率。

2) 温度。将 1 mL 的铵盐溶液分别在 4、25、35、60、80、100 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 30 min,再分别与 9 mL 培养基混合均匀,使碳酸铵和碳酸氢铵的最终质量分数分别为 0.24% 和 0.20%,对照以 1 mL 的无菌水代替药液。然后按照本文“1.2”中的方法进行孢子萌发试验,并计算药液对意大利青霉的抑菌率。

1.5 2 种铵盐对柑橘果实青霉病的抑制作用

1) 柑橘果实的药剂处理。挑选大小一致、无病虫害、果型端正的健康柑橘果实用 0.4% 的次氯酸钠溶液浸泡 2 min,再用自来水将果实冲洗干净、晾干,将果实分别在质量分数为 0.40%、0.80% 的碳酸铵溶液和碳酸氢铵溶液中浸泡处理 10 min,对照用无菌水代替。处理后取出果实晾干待用。

2) 接种贮藏柑橘果实。选取柑橘果实,在其腰部皮下组织等距离注射 50 μL 的意大利青霉分生孢子悬液(菌悬液浓度为 1×10^6 个孢子/mL),每个果

实接种 3 个部位,晾干后放入聚乙烯薄膜袋内,于 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温湿热培养箱内贮藏。每个处理设 3 次重复,每重复接种 5 个果实。贮藏过程中定期测定接种部位的菌斑直径,取其平均值并按照下列公式计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照果实菌斑直径} - \text{处理果实菌斑直径}}{\text{对照果实菌斑直径}} \times 100\%$$

3) 自然贮藏柑橘果实。选取柑橘果实,装入聚乙烯薄膜袋内,每个处理设 3 次重复,每次重复 15 个果实,并放置于 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温湿热培养箱内贮藏,定期统计果实腐烂情况,并计算果实腐烂率。

1.6 数据分析

试验相关数据用 Excel 2013 软件进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 2 种铵盐对意大利青霉孢子萌发的影响

测定结果表明,碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉的孢子萌发均有显著抑制作用,且抑制效果有显著浓度效应,即随着药液浓度的增加,其抑菌效果也逐渐增强(表 1)。当碳酸铵和碳酸氢铵的质量分数分别达到 0.32% 和 0.36% 时,意大利青霉的孢子萌发被完全抑制。但试验结果发现,当碳酸铵的质量分数低于 0.24%、碳酸氢铵的质量分数低于 0.20% 时,2 种药液对意大利青霉的孢子萌发没有抑制作用。

表 1 不同浓度下 2 种铵盐对意大利青霉的抑菌率

药液质量分数 Liquid mass fraction	抑菌率 Inhibition rate	
	碳酸铵 Ammonium carbonate	碳酸氢铵 Ammonium hydrogen carbonate
0(CK)	0.00	0.00
0.20	0.00	50.43 \pm 2.11
0.24	51.67 \pm 5.95	70.47 \pm 2.07
0.28	89.93 \pm 15.02	81.13 \pm 7.71
0.32	100.00	94.60 \pm 6.26
0.36	100.00	100.00

2.2 2 种铵盐对意大利青霉菌丝体生长的影响

测定结果表明,碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉菌丝体生长均有显著抑制作用,且抑制效果有显著的浓度效应(图 1)。同时,随着菌丝体培养时间的延长,2 种铵盐仍能保持良好的抑菌效果。当碳酸铵质量分数达 0.40% 时,意大利青霉菌丝体的生长完全受到抑制。

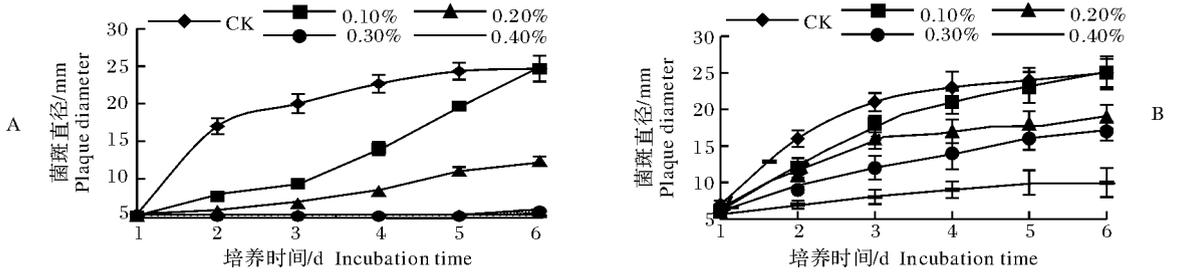


图 1 碳酸铵(A)和碳酸氢铵(B)对意大利青霉菌丝体生长的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of ammonium carbonate (A) and ammonium hydrogen carbonate (B) on mycelial growth of *P. italicum*

2.3 pH 值对 2 种铵盐抑菌活性的影响

这表明在不同的酸碱环境下碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉的抑菌稳定性有显著影响,酸性环境不利于 2 种铵盐抑菌活性的发挥,而在中性及偏碱性环境下碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉均表现出显著的抑菌活性。

从表 2 可知,碳酸铵和碳酸氢铵溶液在酸性环境下,对意大利青霉没有表现出明显的抑菌活性;在 pH 值为 7~11 时,碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉孢子萌发有显著抑制作用,其抑菌率可达 100%。

表 2 不同 pH 值条件下 2 种铵盐对意大利青霉的抑菌率

Table 2 Inhibition rate of 2 kinds ammonium salt in the different pH environment of *P. italicum*

铵盐 Ammonium salt	pH 3.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0	pH 11.0
碳酸铵 Ammonium carbonate	13.6±2.4	18.9±7.6	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
碳酸氢铵 Ammonium hydrogen carbonate	23.9±8.0	10.8±3.6	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0

2.4 温度对 2 种铵盐抑菌活性的影响

温度处理后药剂的抑菌活性略有下降。其原因可能是高温使铵盐发生部分分解,从而导致抑菌活性下降。这表明碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉的抑菌活性在温度变化时具有良好的稳定性。

从表 3 可知,在 4~100 °C 范围内,温度处理对碳酸铵和碳酸氢铵的抑菌活性影响不大,经 35 °C 处理的药液对意大利青霉抑菌活性最强,高于 80 °C 的

表 3 不同温度处理后 2 种铵盐对意大利青霉的抑菌率

Table 3 Inhibition rate of 2 kinds ammonium salt in the treatment of different temperature of *P. italicum*

铵盐 Ammonium salt	4 °C	25 °C	35 °C	60 °C	80 °C	100 °C
碳酸铵 Ammonium carbonate	51.96±1.20	54.99±5.03	55.33±5.03	52.78±6.18	40.52±7.44	33.17±3.05
碳酸氢铵 Ammonium hydrogen carbonate	46.25±2.53	51.91±3.63	48.16±4.05	45.89±3.86	41.92±1.77	36.66±3.09

2.5 2 种铵盐对接种贮藏柑橘青霉病的抑制作用

实菌斑直径菌明显小于对照果实菌斑直径。同时,质量分数为 0.80% 的药液对菌斑生长的抑制作用大于 0.40% 的药液。这表明碳酸铵和碳酸氢铵处理可以有效抑制接种贮藏柑橘青霉病的发生。

由图 2 可知,接种后的柑橘果实在 26 °C 下的贮藏过程中,接种部位的菌斑直径随贮藏时间的延长而增大,第 6 天时达最大值; 2 种铵盐处理的柑橘果

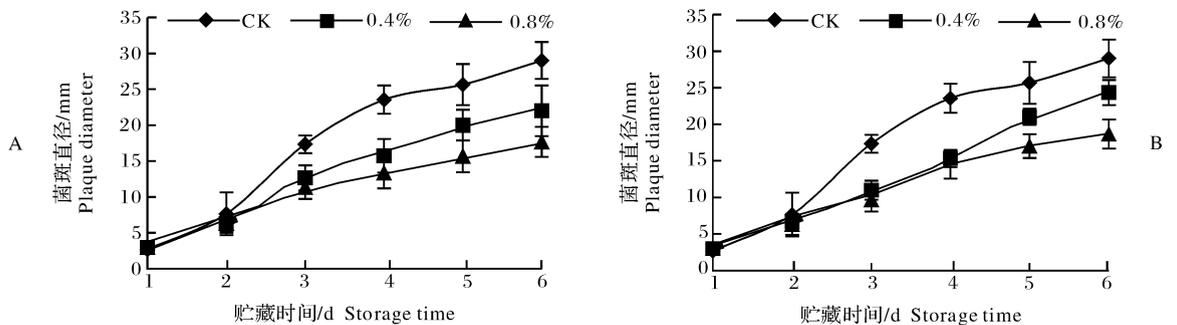


图 2 碳酸铵(A)和碳酸氢铵(B)对人工接种柑橘果实青霉病的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effects of ammonium carbonate (A) and ammonium hydrogen carbonate (B) on the citrus blue mold of the artificial inoculated fruits

2.6 2 种铵盐对自然贮藏柑橘青霉病的抑制作用

由图 3 可知,在自然贮藏条件下,随着贮藏时间的延长,柑橘果实的腐烂率逐渐增加;贮藏前期柑橘果实的腐烂率增长迅速,贮藏后期柑橘果实的腐烂率增加减缓。同时,经碳酸铵和碳酸氢铵处理的

柑橘果实腐烂率显著低于对照果实,尤其在贮藏前期,对照柑橘果实腐烂率已经增至 20% 以上,而经铵盐处理的柑橘果实其腐烂率均为 0。这表明碳酸铵和碳酸氢铵处理能够抑制自然贮藏条件下柑橘果实青霉病的发生。

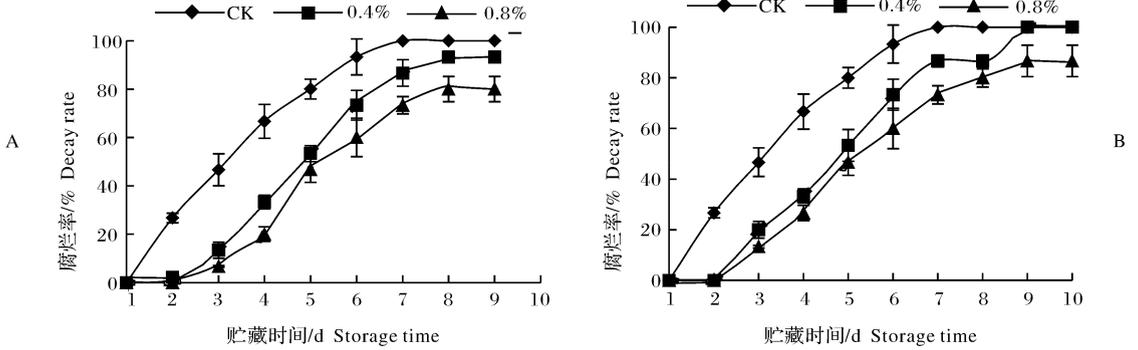


图 3 碳酸铵(A)和碳酸氢铵(B)处理对自然贮藏条件下柑橘青霉病的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of ammonium carbonate (A) and ammonium hydrogen carbonate (B) on the citrus blue mold during storage

3 讨论

柑橘青霉病是引起柑橘类果实贮藏过程中腐烂变质的重要病害,寻找安全、高效的柑橘防腐剂一直是柑橘生长中研究的热点问题。已有的研究结果表明,碳酸盐和碳酸氢盐处理能显著降低冷藏条件(5℃)下柑橘类果实采后绿霉病的发生,但药效持续性较差^[9]。随后的研究结果又发现,热碳酸钠溶液抑制柑橘绿霉病的效果更好,并可以降低碳酸钠的使用量^[10-11]。碳酸钠结合拮抗菌处理柑橘果实可以有效抑制贮藏过程中柑橘绿霉病的发生,其效果优于单独碳酸钠和拮抗菌处理^[12]。Montesinos-Herrero 曾报道碳酸钾对主要柑橘类果实采后青霉病的控制也表现出显著的抑制作用^[13]。随后又报道氨气处理对贮藏过程中柑橘和柠檬果实的青霉病有显著抑制效果,但浓度过高会导致柠檬果实色泽变暗^[14]。

碳酸铵和碳酸氢铵同时具备碳酸根、碳酸氢根离子和铵根离子,它们是否比碳酸钠、碳酸氢钠和氨水对柑橘青霉病具有更好的防控效果,目前对此研究相对较少。本试验结果表明,碳酸铵和碳酸氢铵对意大利青霉的孢子萌发具有显著抑制作用。当质量分数分别达到 0.32% 和 0.36% 时,意大利青霉的孢子萌发被完全抑制;中性及偏碱性环境有利于碳酸铵和碳酸氢铵抑菌活性的发挥。人工接种和自然贮藏试验结果表明,质量分数为 0.80% 的碳酸铵和

碳酸氢铵溶液可以显著降低柑橘果实青霉病的发病率,且有效作用浓度明显低于前人报道的碳酸钠和碳酸钾抑制采后柑橘青/绿霉病的有效浓度(3%)^[11]。同时,本试验结果还表明,随着贮藏时间的延长,2 种铵盐对柑橘青霉病的控制作用有所下降,这与前人对其他碳酸盐抑制柑橘青霉病的试验结果相似,因此,碳酸铵和碳酸氢铵能够有效抑制柑橘青霉病的发生,在采后柑橘的防腐保鲜中具有良好的应用前景与开发价值。另外,碳酸铵和碳酸氢铵作为防治采后柑橘青霉病的化学药剂具有安全、高效、成本低廉等优点。有关碳酸铵和碳酸氢铵与其他常见采后柑橘防腐剂的协同效果及其抑制柑橘青霉病的作用机理还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 闵晓芳,邓伯勋,陈丽锋,等. 柑橘采后致病青霉的鉴定[J]. 果树学报,2007,24(5):653-656,730.
- [2] 朱子华,盛恒彬,梅象信. 果实采后病害种类[J]. 河南林业科技,2004(4):7-18.
- [3] 赖传雅,袁高庆. 农业植物病理学[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [4] BENDOW J, SUGAR D. Fruit surface colonization and biological control of postharvest disease of pear by preharvest yeast application [J]. Plant Disease, 1999, 83: 839-844.
- [5] KINAY P. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California [J]. Crop Protection, 2007, 26(4): 647-656.

- [6] CERIONI L, SEPULVEDA M, RUBIO-AMES Z, et al. Control of lemon postharvest diseases by low-toxicity salts combined with hydrogen peroxide and heat [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 83: 17-21.
- [7] YOUSSEF K, LIGORIO A, NIGRO F. Activity of salts incorporated in wax in controlling postharvest diseases of citrus fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 65: 39-43.
- [8] 杨书珍, 彭丽桃. 蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉菌的抑制作用及稳定性研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(11): 87-90.
- [9] SMILANICK J L. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy [J]. *Plant Disease*, 1999, 83(2): 139-145.
- [10] ZAMANI M. Biological control of *Penicillium digitatum* on oranges using *Pseudomonas* spp. either alone or in combination with hot sodium bicarbonate dipping [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2008, 37(6): 605-608.
- [11] ZAMANI M. Control of *penicillium digitatum* on orange fruit combining pantoa agglomrans with hot sodium bicarbonate dipping [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2009, 91(2): 437-442.
- [12] USALL J. Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 50(1): 1-7.
- [13] MONTESINO-HERRERO C. Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest penicillium decay on major citrus species and cultivars [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 52(1): 117-125.
- [14] MONTESINO-HERRERO C. Control of citrus postharvest decay by ammonia gas fumigation and its influence on the efficacy of the fungicide imazalil [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 59(1): 85-93.

Inhibitory effect of ammonium carbonate and ammonium hydrogen carbonate on blue mold of citrus fruits

LIU Li-mei ZHANG Qiang YANG Shu-zhen WANG Le ZHOU Jie PENG Li-tao
College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In this research use *Penicillium italicum* which causes the major loss of citrus fruits during storage and distribution as the research object, and *in vitro* and *in vivo* evaluation to determine the antibacterial activity of ammonium carbonate and ammonium bicarbonate. The effect of ammonium carbonate and bicarbonate on conidial germination and mycelium growth of *P. italicum* was evaluated. Inhibition of both compounds on disease incidence of citrus fruits either naturally or inoculated with the pathogen was also investigated. The results demonstrated that ammonium carbonate and bicarbonate demonstrated powerful inhibitory effect on spore germination and mycelium growth of the pathogen with the minimum inhibition mass fraction for spore germinations of 0.32% and 0.36% respectively. The inhibitory effect of both compounds on the pathogen was quite stable after the solutions were treated under different temperatures (4-100 °C) for 30 minutes. Both compounds demonstrated strong inhibition with the media at neutral and alkaline pH. Both compounds at the mass fraction of 0.80% could significantly reduce the decay rates of citrus fruits either naturally or inoculated with the pathogen.

Key words citrus; *Penicillium italicum*; ammonium carbonate; ammonium hydrogen carbonate

(责任编辑:陈红叶)